辣椒碱对小菜蛾的驱避活性及其体内谷胱甘肽-S-转移酶和 Na^+, K^+-ATP 酶活性的影响

纪明山，刘少武，谷祖敏，魏松红，王英姿
（沈阳农业大学植物保护学院，辽宁省生物农药工程技术研究中心，沈阳 110161）

摘要：采用常规生测方法和酶活力测定方法，初步研究了辣椒碱对小菜蛾 *Plutella xylostella* L.的产卵忌避和拒食作用，及其对小菜蛾体内谷胱甘肽-S-转移酶、Na^+，K^+-ATP 酶活性的影响，以期阐明辣椒碱对害虫的作用机制。结果表明，辣椒碱对小菜蛾表现出较强的产卵忌避活性和拒食活性。在 6.25×10^4 mg/L 浓度下，处理 24 h 辣椒碱对小菜蛾的非选择性产卵忌避率达 96.55%，选择性产卵忌避率为 84.30%；在相同浓度下，处理 48 h 辣椒碱对小菜蛾的非选择性拒食率达 81.47%，选择性拒食率为 69.69%。另外，经 1.25×10^5 mg/L 辣椒碱不同时间处理后，小菜蛾体内的谷胱甘肽-S-转移酶酶活力和 Na^+，K^+-ATP 酶活力与对照相比均产生了波动，处理 18 h 时小菜蛾体内 GSTs 活力最高，为 152.01 U·mg^{-1} pro·min^{-1}，处理 1 h 时小菜蛾体内 Na^+，K^+-ATP 酶活力最高，为 19.99 U·mg^{-1} pro·min^{-1}。结果说明辣椒碱能够影响小菜蛾产卵和取食行为，并且对其体内的酶系也产生了影响。

关键词：小菜蛾；辣椒碱；产卵忌避作用；拒食作用；谷胱甘肽-S-转移酶；Na^+，K^+-ATP 酶
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2008)10-1039-05

Repellent activity of capsaicin and its effects on glutathione-S-transferase and Na^+, K^+-ATPase activity in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

JI Ming-Shan, LIU Shao-Wu, GU Zu-Min, WEI Song-Hong, WANG Ying-Zi (Biopesticide Engineering Research Center of Liaoning Province, College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The repellent activity of capsaicin against *Plutella xylostella*, and the effects of capsaicin on activities of glutathione-S-transferase and Na^+, K^+-ATPase in the 3rd instar larvae of the moth were tested in the laboratory with conventional methods. The results showed that capsaicin had strong oviposition deterrence and antifeedant activity against *P. xylostella*. At a concentration of 6.25×10^4 mg/L, the nonselective oviposition deterrence rate was 96.55% 24 h after capsaicin application, while the selective oviposition deterrence rate was 84.30%. At the same concentration, the nonselective antifeedant rate and selective antifeedant rate was 81.47% and 69.69% respectively 48 h after capsaicin application. In addition, glutathione-S-transferase and Na^+, K^+-ATPase activities fluctuated after *P. xylostella* was treated with capsaicin for different hours. When *P. xylostella* was treated with 1.25×10^5 mg/L capsaicin, the highest GSTs and ATPase activities were found at 18 h and 1 h after treatment, respectively. These results suggested that capsaicin can disturb the oviposition and feeding of the moth, and influence some enzymes in its body.

Key words: *Plutella xylostella*; capsaicin; oviposition deterrence; antifeedant activity; glutathione-S-transferase; Na^+, K^+-ATPase

辣椒碱是存在于辣椒果实中的一种极度辛辣的香草酰氨类生物碱(戴雄泽和刘志敏，2005)。孔国顺等(2005)和邹华娇(2002)的研究结果表明，9%辣椒碱·烟碱微乳剂对小菜蛾 *Plutella xylostella* L.、菜

基金项目：辽宁省"十一五"科技攻关项目(2006215004)；辽宁省工程技术研究中心专项(200535)
作者简介：纪明山，男，1966 年生，河北任丘人，教授，博士生导师，主要从事生物农药研究，Tel.：024-88492673；E-mail：jimingshan@163.com
收稿日期 Received：2008-04-26；接受日期 Accepted：2008-09-03

青虫 *Pieris rapae* L. 和菜蚜 *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach)均有良好的防治效果。但鲜有辣椒碱对害虫作用机制方面的研究。本文主要研究了辣椒碱对小菜蛾的驱避作用及其对小菜蛾体内谷胱甘肽-S-转移酶(GSTs)和 Na^+,K^+-ATP 酶(Na^+,K^+-ATPase)活力的影响,以便为阐明辣椒碱的杀虫机制提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试虫和试剂

小菜蛾由沈阳化工研究院生测中心提供,室内继代饲养、繁殖,建立试验种群,挑选健康一致的适龄幼虫供试。

辣椒碱(≥90%),购自青岛海化阻燃材料有限公司;谷胱甘肽-S-转移酶试剂盒和 Na^+,K^+-ATP 酶试剂盒,购自南京建成生物工程研究所;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 驱避活性测定方法

1.2.1 产卵忌避活性测定:选择性产卵忌避活性(周琼等,2006),将辣椒碱用丙酮稀释为 3.91×10^3,7.81×10^3,1.56×10^4,3.13×10^4,6.25×10^4 mg/L 的系列浓度,将制备好的甘蓝叶碟(d = 2.1 cm)在不同浓度药液中浸 10 s,晾干后放入衬有湿滤纸的 500 mL 烧杯中,2 枚处理叶和 2 枚对照叶交错排列,处理叶和对照叶均为 1 枚正面朝上,1 枚背面朝上。然后接入 2 对小菜蛾成虫,用纱布封口并放置蘸有 10%蜂蜜的棉球,丙酮处理为对照,重复 3 次,24 h 后取出叶片,记录各叶片上的落卵量,并计算产卵忌避率。非选择性产卵忌避活性处理及调查方法类似选择性产卵忌避试验,但每个烧杯中的 4 枚叶均为同一处理叶或对照叶。

计算公式:

选择性产卵忌避率(%) =

$$\frac{\text{对照落卵量} - \text{处理落卵量}}{\text{对照落卵量} + \text{处理落卵量}} \times 100$$

非选择性产卵忌避率(%) =

$$\frac{\text{对照落卵量} - \text{处理落卵量}}{\text{对照落卵量}} \times 100$$

1.2.2 拒食活性测定:选择性拒食活性测定参考杨玉英等(2006),将辣椒碱用丙酮稀释为 3.91×10^3,7.81×10^3,1.56×10^4,3.13×10^4,6.25×10^4 mg/L 的系列浓度,将制备好甘蓝叶碟(d = 2.1 cm)在不同浓度药液中浸 10 s,晾干后放入衬有湿滤纸培养皿中,对照为丙酮处理。同一培养皿中相对放入处理和对照叶碟各 1 枚,然后接入 1 头饥饿 3 h 的小菜蛾 3 龄幼虫,用纱布封住皿口,每处理重复 5 次,48 h 后将残余叶片取出、保存。采用尹克林等(2005)等测定葡萄叶面积的方法,利用计算机软件(CorelDRAW 11.0 和 AutoCAD 2002)计算叶面积,并计算拒食率。非选择性拒食活性处理及计算方法同选择性拒食活性测定,只是同一培养皿中仅放入一枚处理叶碟,对照叶碟放入另一培养皿中。

计算公式:

选择性拒食率(%) =

$$\frac{\text{对照取食面积}(mm^2) - \text{处理取食面积}(mm^2)}{\text{对照取食面积}(mm^2) + \text{处理取食面积}(mm^2)} \times 100$$

非选择性拒食率(%) =

$$\frac{\text{对照取食面积}(mm^2) - \text{处理取食面积}(mm^2)}{\text{对照取食面积}(mm^2)} \times 100$$

1.3 酶液制备

将辣椒碱用丙酮稀释成浓度为 1.25×10^5 mg/L 的药液,点滴于 3 龄小菜蛾前胸背板(每次处理约 180 头),每头 0.25 μL,对照用丙酮处理,在处理后 1,6,12,18,24 h 挑出活虫体制备酶液。

1.3.1 GSTs 酶液制备:取药剂或对照处理过的小菜蛾 3 龄幼虫 30 头,加入虫体重量 9 倍的 0.86%冷生理盐水匀浆,4℃,3 000 r/min 离心 15 min,取上清液为待测酶液。

1.3.2 Na^+,K^+-ATP 酶液制备:参照 Feng 等(1992)的方法,取处理过的小菜蛾 3 龄幼虫 20 头,加入 10 倍体积的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4,内含 1 mmol/L EDTA、0.25 mol/L 蔗糖)匀浆。3 000 r/min离心 10 min,取上清液在 13 000 r/min 条件下离心 30 min,取沉淀用 2 mL 的 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液悬浮作为酶源。

1.4 GSTs 和 Na^+,K^+-ATP 酶活力测定方法

1.4.1 反应原理:GSTs 具有催化还原型谷胱甘肽(GSH)与 1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB 底物)结合的能力,在一定反应时间内,其活性高低与反应前后底物浓度的变化呈线性关系。可通过检测 GSH 浓度的高低来反映 GSTs 活力的大小,GSH 浓度降低越多则表明 GSTs 活力越高。Na^+,K^+-ATP 酶可分解 ATP 生成 ADP 及无机磷,通过测定无机磷的量可判断 Na^+,K^+-ATP 酶活力的高低。

1.4.2 GSTs 活力测定步骤:首先进行酶促反应,测定管(酶管)加入 0.3 mL 基质液和 0.1 mL 酶液;对照管(非酶管)只加入 0.3 mL 基质液,混匀后在 37℃

下水浴 10 min，测定管再加入 1 mL 蛋白沉淀剂和 1 mL 无水乙醇，对照管加入 1 mL 蛋白沉淀剂、1 mL 无水乙醇和 0.1 mL 酶液，混匀后 4 000 r/min 离心 10 min，取上清液作显色反应。显色反应过程中，空白管加入 2 mL GSH 标准品溶剂应用液、2 mL 缓冲液和 0.5 mL 显色剂，标准管加入 2 mL GSH 标准品、2 mL 缓冲液和 0.5 mL 显色剂，测定管和对照管分别加入 2 mL 上清液、2 mL 缓冲液和 0.5 mL 显色剂，混匀后室温放置 15 min，在 412 nm 处测定吸光度值，用蒸馏水调零。重复操作 3 次。GSTs 活性规定每毫克组织蛋白在 37℃反应 1 min 后，扣除非酶促反应，使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol/L 为一个酶活力单位。

1.4.3 Na^+，K^+ -ATP 酶活力测定步骤：首先进行酶促反应，测定管分别加入 0.12 mL 蒸馏水、0.1 mL 酶液、0.04 mL 抑制剂和 0.42 mL 基质液；对照管只加入 0.16 mL 蒸馏水和 0.42 mL 基质液，混匀后在 37℃下反应 10 min，测定管再加入 0.1 mL 终止剂，对照管加入终止剂和酶液各 0.1 mL，混匀后 4 000 r/min离心 10 min，取上清液定磷。定磷过程中，空白管加入 0.3 mL 蒸馏水和 1.0 mL 显色剂，标准管加入 0.3 mL 磷标液和 1.0 mL 显色剂，测定管和对照管分别加入 0.3 mL 上清液和 1.0 mL 显色剂，混匀后室温静置 2 min，各管再加入 1.0 mL 稳定剂，混匀后室温静置 5 min，在 636 nm 处测定吸光度值，用蒸馏水调零。重复操作 3 次。Na^+，K^+ -ATP 酶活性规定每小时每毫克组织蛋白中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位。。

1.5 酶源蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝法（Bradford，1976），测定各处理酶液的蛋白质含量。

1.6 数据统计与处理

利用 DPS 统计软件进行数据统计分析。显著性检验采用 Ducan's 新复极差法。

2 结果分析

2.1 辣椒碱对小菜蛾产卵忌避作用

试验结果（表 1）表明，辣椒碱对小菜蛾表现出较强的产卵忌避活性，随着辣椒碱浓度的增加，其对小菜蛾的产卵忌避率也不断增加。在 6.25×10^4 mg/L 浓度下处理 24 h，辣椒碱对小菜蛾的非选择性产卵忌避率达 96.55%，选择性产卵忌避率为 84.30%；非选择性产卵忌避率的 EC_{50} 值为 2.73×10^3 mg/L，回归方程为 $y = 9.11509 + 1.60515x$（$r = 0.9182$）；选择性产卵忌避率的 EC_{50} 值为 3.11×10^3 mg/L，回归方程为 $y = 7.09266 + 0.83463x$（$r = 0.8756$）。

表 1　不同浓度辣椒碱对小菜蛾的产卵忌避活性

Table 1　Oviposition deterrence activity of capsaicin at different concentrations against *Plutella xylostella* L.

浓度 Concentration (mg/L)	非选择性产卵忌避活性 Nonselective oviposition deterrence activity		选择性产卵忌避活性 Selective oviposition deterrence activity		
	平均落卵量 Average eggs laid	忌避率（%） Oviposition repellent ratio	平均落卵量 Average eggs laid		忌避率（%） Oviposition repellent ratio
			处理 Treatment	对照 Control	
6.25×10^4	1.00	96.55 ± 3.45	2.40	20.00	84.30 ± 15.84
3.13×10^4	1.67	94.17 ± 1.84	1.80	24.60	86.25 ± 3.48
1.56×10^4	5.00	82.42 ± 8.95	6.00	25.60	62.16 ± 7.15
7.81×10^3	3.67	87.02 ± 2.34	3.80	28.80	70.80 ± 17.99
3.91×10^3	12.67	55.47 ± 12.21	10.80	29.00	50.86 ± 29.66
对照 Control	28.33	–	–	–	–

表 2　不同浓度辣椒碱对小菜蛾的拒食活性

Table 2　Antifeedant activity of capsaicin at different concentrations against *Plutella xylostella* L.

浓度 Concentration (mg/L)	非选择性拒食活性 Nonselective antifeedant activity		选择性拒食活性 Selective antifeedant activity		
	平均取食面积（mm^2） Average acreage	拒食率（%） Antifeedant ratio	平均取食面积 Average acreage（mm^2）		拒食率（%） Antifeedant ratio
			处理 Treatment	对照 Control	
6.25×10^4	13.14	81.47 ± 13.96	6.52	36.51	69.69 ± 6.17
3.13×10^4	18.11	74.47 ± 23.12	9.61	32.20	54.05 ± 4.99
1.56×10^4	18.96	73.26 ± 10.24	14.71	52.13	55.98 ± 1.17
7.81×10^3	21.59	69.55 ± 17.86	13.33	33.39	42.94 ± 5.42
3.91×10^3	21.95	69.06 ± 19.49	38.80	55.90	18.05 ± 4.28
对照 Control	70.93	–	–	–	–

2.2 辣椒碱对小菜蛾幼虫的拒食作用

结果表明(表 2),辣椒碱对小菜蛾幼虫表现出较强的拒食活性,随着辣椒碱浓度的增加,其对小菜蛾的拒食率也不断增加。在 6.25×10^4 mg/L 浓度下处理 48 h,辣椒碱对小菜蛾幼虫的非选择性拒食率达 81.47%,其回归方程为 $y = 6.17073 + 0.29684x$($r = 0.9315$),AFC_{50}值为 1.10×10^2 mg/L;选择性拒食率为 69.69%,回归方程为 $y = 6.72983 + 0.98125x$($r = 0.9298$),AFC_{50}值为 1.73×10^4 mg/L。

2.3 辣椒碱对小菜蛾体内 GSTs 活力影响

经 1.25×10^5 mg/L 辣椒碱不同时间处理后的小菜蛾幼虫,存活虫体内的 GSTs 活力变化如图 1 所示,各处理的 GSTs 活力在 107.62 U·mg^{-1} pro·min^{-1} 到 152.01 U·mg^{-1} pro·min^{-1} 间波动,且在处理 1 h 和 18 h 时,小菜蛾体内 GSTs 活力显著高于对照;1.25×10^5 mg/L 辣椒碱处理 18 h 时,小菜蛾体内 GSTs 活力达到最高,为 152.01 U·mg^{-1} pro·min^{-1}。

2.4 辣椒碱对小菜蛾体内 Na^+,K^+-ATP 酶活力影响

经 1.25×10^5 mg/L 辣椒碱不同时间处理后的小菜蛾幼虫,存活虫体内 Na^+,K^+-ATP 酶活力变化如图 2 所示,各处理的 Na^+,K^+-ATP 酶活力在 17.30 U·mg^{-1} pro·min^{-1} 到 19.99 U·mg^{-1} pro·min^{-1} 间波动,并随着处理时间的延长,对照与处理的 Na^+,K^+-ATP 酶活力都逐渐降低,但处理的 Na^+,K^+-ATP 酶活力降低较缓慢,且在处理 18 h 和 24 h 时,小菜蛾体内 Na^+,K^+-ATP 酶活力显著高于对照;1.25×10^5 mg/L 辣椒碱处理 1 h 时,小菜蛾体内 Na^+,K^+-ATP 酶活力最高,为 19.99 U·mg^{-1} pro·min^{-1},但低于对照的 Na^+,K^+-ATP 酶活力。

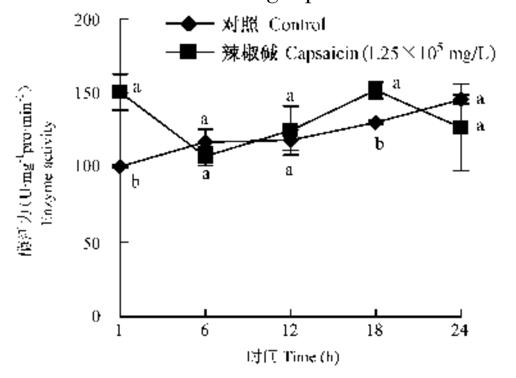


图 1 辣椒碱处理下小菜蛾体内 GSTs 活力的时序变化

Fig. 1 Time serial change in GSTs activity of *Plutella xylostella* L. when treated with capsaicin

图中数据为平均值 ± 标准差;不同字母表示处理与对照间在 5%水平上差异显著。下同。Data in the figure are presented as mean ± *SD*; the different lethers indicate significant difference at 0.05 level between the treatment and the control. The same below.

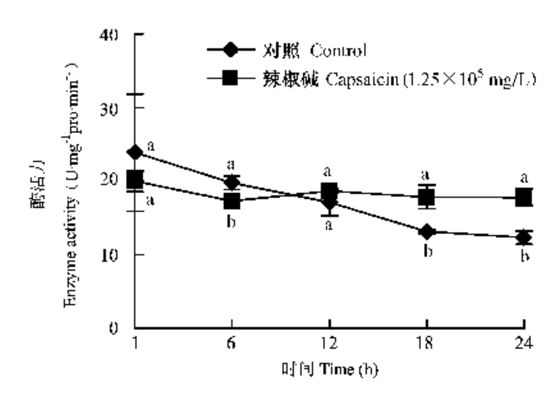


图 2 辣椒碱处理下小菜蛾体内 Na^+,K^+-ATP 酶活力的时序变化

Fig. 2 Time serial change in Na^+, K^+-ATPase activity of *Plutella xylostella* L. treated with capsaicin

3 讨论

本研究毒性试验结果表明,辣椒碱表现出较强的产卵忌避活性和拒食活性,说明辣椒碱能够影响害虫产卵及取食行为,能够降低害虫的产卵量和取食量,从而降低害虫对作物的危害。

GSTs 是昆虫体内参与内源及外源性物质代谢的重要解毒酶,在昆虫的寄主适应性及抗药性的形成中起着重要作用(唐振华和周成理,1993)。Na^+,K^+-ATP 酶就是 Na^+ 和 K^+ 离子泵,它广泛存在于各类生物的细胞膜上,在可兴奋细胞中有十分重要的作用,它维持细胞膜两侧电位的动态平衡,保障神经冲动顺利持续地进行。当 Na^+,K^+-ATP 酶受到抑制时,膜对离子的通透性降低,膜电位发生变化,从而可影响到神经细胞的传导功能。通过本研究辣椒碱对 GSTs 活性影响的试验结果可知,随处理时间的延长,小菜蛾体内的 GSTs 活力与对照相比产生了不规则的波动,说明辣椒碱对 GSTs 活力的影响随时间变化规律不明显。而分析辣椒碱对 Na^+,K^+-ATP 酶活性影响的结果可知,与对照相比,受到辣椒碱处理的小菜蛾,随处理时间的延长,其体内的 Na^+ 和 K^+-ATP 酶活性逐渐高于正常的水平,说明受到辣椒碱的刺激后,小菜蛾体内的细胞膜电位和细胞膜对离子的通透性都有所升高,这与小菜蛾受辣椒碱处理后表现为抽搐,不规则卷曲等现象相一致。

植食性昆虫对植物体内的次生代谢化学产物的防御机制往往是通过自身体内的生理生化及行为调节去适应,其中体内解毒酶系的活性调节是很重要的方面。因此,本文研究了辣椒碱对小菜蛾的产卵

忌避作用、拒食作用及其对小菜蛾体内 GSTs 和 Na^+，K^+-ATP 酶活性的影响。试验结果初步表明，辣椒碱可通过影响害虫的产卵和取食行为，以及影响害虫体内的酶活性（如 GSTs 和 Na^+，K^+-ATP 酶）来驱除害虫，降低害虫的危害。但是，杀虫物质对害虫的作用机制是一个极其复杂的过程，杀虫物质对害虫作用机制的研究也是昆虫毒理学研究中的一个难点。因此，辣椒碱对害虫的作用机理还有待深入的研究。

参考文献（References）

Bradford MM，1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*，72：248－254.

Dai XZ，Liu ZM，2005. Recent advances in capsaicinoids research. *Journal of China Capsicum*，（4）：13－16.［戴雄泽，刘志敏，2005. 辣椒素类物质研究进展. 辣椒杂志，（4）：13－16］

Feng GL，Jacques RM，Clark JM，1992. Suppression of pyrethroid-dependent neurotransmitter release from synaptosomes of knockdown-resistant house flies under pulsed-depolarization conditions during continuous perfusion. *Pesticide Biochemistry and Physiology*，42（1）：64－77.

Kong GS，Liu TL，Zhu YL，Wang XX，2005. Control effect of 8 biological pesticides against cabbage worm and diamondback moth. *Journal of Changjiang Vegetables*，（3）：39－40.［孔国顺，刘天龙，朱元良，王新星，2005. 8 种生物农药防治菜青虫和小菜蛾效果试验. 长江蔬菜，（3）：39－40］

Tang ZH，Zou CL，1993. The role of detoxification esterases in resistance of diamondback moth *Plutella xylostella* larvae. *Acta Entomologica Sinica*，36（1）：8－13.［唐振华，周成理，1993. 解毒酯酶在小菜蛾幼虫抗药性中的作用. 昆虫学报，36（1）：8－13］

Yang YY，He DH，Wang J，2006. Antifeeding activity of the crude extracts from *Ephedra sinica* to *Plutella xylostella* L. *Plant Protection*，32（5）：35－38.［杨玉英，贺达汉，王婧，2006. 草麻黄提取物对小菜蛾幼虫的拒食活性研究. 植物保护，32（5）：35－38］

Yin KL，Song LQ，Liu SJ，Zhang C，2005. Study on the method of measuring the leaf area of grapevine by the digital image processing techniques. http://www.paper.edu.cn.［尹克林，宋来庆，刘素君，张诚，2005. 数字化图形技术测定葡萄叶面积方法研究. 中国科技论文在线. http：//www.paper.edu.cn］

Zou Q，Liu BR，Shu YH，He Y，2006. Antifeedant and oviposition deterrent effect of extracts from *Xanthium sibiricum* and other medicinal plants against *Plutella xylostella* L.（Lepidoptera：Plutellidae）. *China Vegetables*，（2）：17－20.［周琼，刘炳荣，舒迎花，何艳，2006. 苍耳等药用植物提取物对小菜蛾的拒食作用和产卵忌避效果. 中国蔬菜，（2）：17－20］

Zou HJ，2002. Efficacy test of 9% capsaicin nicotine ME against *Pieris rapae*（Linnaeus）and *Myzus persicae*（Sulzer）. *Plant Protection*，28（1）：45－47.［邹华娇，2002. 9%辣椒碱·烟碱微乳剂防治菜青虫和菜蚜效果试验. 植物保护，28（1）：45－47］

（责任编辑：赵利辉）